

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

AB

(11)Publication number : 2002-306182

(43)Date of publication of application : 22.10.2002

(51)Int.Cl.

C12N 15/09

C07K 19/00

C12N 1/21

C12P 21/02

C12P 21/06

(21)Application number : 2001-156444

(71)Applicant : TOYOTA CENTRAL RES & DEV  
LAB INC

(22)Date of filing : 25.05.2001

(72)Inventor : IMAEDA TAKAO  
YAMADA YUKIO  
HIRAI MASAKATA  
SHIMAMURA TAKASHI  
KODA KATSUNORI  
MURAMOTO NOBUHIKO

(30)Priority

Priority number : 2000161090 Priority date : 26.05.2000 Priority country : JP

## (54) METHOD FOR PRODUCING ANTIBACTERIAL PROTEIN AND FUSED PROTEIN

## (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To realize an inexpensive and advantageous large amount expressing system of a basic antibacterial protein on a condition of forming proper disulfide bonds for exhibiting the antibacterial activity.

SOLUTION: This method for producing the antibacterial protein is provided by expressing a fused protein not having the antibacterial activity, from the above basic antibacterial protein with a partner protein having <7 isoelectric point and a shaperon function, collecting the fused protein, separating the both and activating the antibacterial protein with a partner protein.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-306182

(P2002-306182A)

(43) 公開日 平成14年10月22日 (2002. 10. 22)

| (51) Int.Cl. <sup>7</sup> | 識別記号  | F I              | テーマコード(参考)   |
|---------------------------|-------|------------------|--------------|
| C 1 2 N 15/09             | Z N A | C 0 7 K 19/00    | 4 B 0 2 4    |
| C 0 7 K 19/00             |       | C 1 2 N 1/21     | 4 B 0 6 4    |
| C 1 2 N 1/21              |       | C 1 2 P 21/02    | C 4 B 0 6 5  |
| C 1 2 P 21/02             |       | 21/06            | 4 H 0 4 5    |
| 21/06                     |       | C 1 2 N 15/00    | Z N A A      |
|                           |       | 審査請求 未請求 請求項の数11 | O L (全 13 頁) |

(21) 出願番号 特願2001-156444(P2001-156444)

(22) 出願日 平成13年5月25日(2001. 5. 25)

(31) 優先権主張番号 特願2000-161090(P2000-161090)

(32) 優先日 平成12年5月26日(2000. 5. 26)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(出願人による申告) 国等の委託研究の成果に係る特許出願(平成12年度新エネルギー・産業技術総合開発機構植物利用エネルギー使用合理化工業原料生産技術の研究開発委託研究、産業活力再生特別措置法第30条の適用を受けるもの)

(71) 出願人 000003609

株式会社豊田中央研究所

愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道41番地の1

(72) 発明者 今枝 孝夫

愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道41番地の1 株式会社豊田中央研究所内

(72) 発明者 山田 幸生

愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道41番地の1 株式会社豊田中央研究所内

(74) 代理人 100097733

弁理士 北川 治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗菌蛋白質の製造方法、蛋白質融合体

(57) 【要約】

【課題】 適正なジスルフィド結合の形成を抗菌活性発現の条件とする塩基性抗菌蛋白質の安価で有利な大量発現系を実現する。

【解決手段】 宿主細胞内において、上記塩基性抗菌蛋白質と、等電点が7未満でシャペロン機能を有するパートナー蛋白質との抗菌不活性な蛋白質融合体を発現させ、この蛋白質融合体を採取した後、両者を分離して、パートナー蛋白質により抗菌蛋白質を活性化する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 一定様式の分子内ジスルフィド結合の形成を活性型の条件とする塩基性の抗菌蛋白質Aを、等電点がpH7未満でありシャペロン機能を有するパートナー蛋白質Bとの蛋白質融合体として原核細胞内で発現させ、これを採取した後、前記パートナー蛋白質Bの機能の利用を含む活性化工程によって前記抗菌蛋白質Aを活性型に変換することを特徴とする抗菌蛋白質の製造方法。

【請求項2】 前記蛋白質融合体の発現を、前記蛋白質融合体をコードするDNAを発現可能に導入した原核細胞の培養によって行うことを特徴とする請求項1に記載の抗菌蛋白質の製造方法。

【請求項3】 前記抗菌蛋白質Aがそれぞれ植物由来のチオニン、PRプロテイン、リビッドトランスファープロテイン、リボゾーム不活性化プロテインのいずれか、あるいは植物、昆虫又はヒト由来のディフェンシンであることを特徴とする請求項1又は請求項2に記載の抗菌蛋白質の製造方法。

【請求項4】 前記パートナー蛋白質Bが、以下の1)又は2)のいずれかであることを特徴とする請求項1～請求項3のいずれかに記載の抗菌蛋白質の製造方法。

1) プロテインジスルフィドイソメラーゼ又は植物由来のチオニンに対して塩基配列上の下流に存在するDNAによってコードされている酸性蛋白質。

2) チオレドキシン又はシャペロン。

【請求項5】 前記パートナー蛋白質Bが、少なくとも等電点がpH7未満である酸性パートナー蛋白質B1と、少なくともシャペロン機能を有するシャペロンパートナー蛋白質B2とからなることを特徴とする請求項1～請求項3のいずれかに記載の抗菌蛋白質の製造方法。

【請求項6】 一定様式の分子内ジスルフィド結合の形成を活性型の条件とする塩基性の抗菌蛋白質Aと、等電点がpH7未満でありシャペロン機能を有するパートナー蛋白質Bとの融合体であり、前記抗菌蛋白質Aとパートナー蛋白質Bとが酵素により切断可能なオリゴペプチド部分を介して一連のポリペプチド鎖として構成されていることを特徴とする蛋白質融合体。

【請求項7】 一定様式の分子内ジスルフィド結合の形成を活性型の条件とする塩基性の抗菌蛋白質Aと、少なくとも等電点がpH7未満である酸性パートナー蛋白質B1と、少なくともシャペロン機能を有するシャペロンパートナー蛋白質B2との融合体であることを特徴とする蛋白質融合体。

【請求項8】 前記酸性パートナー蛋白質B1がフミコラ・インソレンス(*Fumicola insolens*)由来のプロテインジスルフィドイソメラーゼのカルボキシ末端領域であり、前記シャペロンパートナー蛋白質B2がペプチジルプロリル-シス-トランス-イソメラーゼであることを特徴とする請求項7に記載の蛋白質融合体。

【請求項9】 一定様式の分子内ジスルフィド結合の形成を活性型の条件とする塩基性の抗菌蛋白質Aと共に蛋白質融合体を形成するために用いられる蛋白質であって、少なくとも等電点がpH7未満である酸性パートナー蛋白質B1と、少なくともシャペロン機能を有するシャペロンパートナー蛋白質B2とからなることを特徴とするパートナー蛋白質。

【請求項10】 請求項6～請求項8のいずれかに記載の蛋白質融合体をコードすることを特徴とするDNA。

【請求項11】 請求項10に記載のDNAを発現可能に導入した原核細胞であることを特徴とする宿主細胞。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、一定様式の分子内ジスルフィド結合の形成を活性型の条件とする塩基性抗菌蛋白質の大量発現系に関する。

【0002】

【従来の技術】遺伝子組換え技術の応用により、種々の機能を持つ蛋白質が細菌、真菌、哺乳動物等の多様な発現系で発現されるようになって来ている。蛋白質の効率的な大量生産とすることを考えた時、特に大腸菌等の原核細胞を宿主とする発現系が有利である。一方、多くの産業分野において注目されている抗菌蛋白質の発現については、抗菌蛋白質の宿主細胞に対する毒性、比較的低分子量である抗菌蛋白質の宿主細胞内での分解等の特有の問題がある。そのため、例えば大腸菌での抗菌蛋白質生産において、次のような技術が提案されている。

【0003】まず、抗菌蛋白質と酸性蛋白質との融合化ユニットをマルチマー化することによって、抗菌蛋白質の毒性をマスキングすると共にその細胞内での分解を抑制する方法が提案されている(Jae H. Lee, Il Minn, Chan B, et al(1998) Protein Expression and Purification 12 :53-60)。又、抗菌蛋白質生産を不溶性画分に発現されるプロキモシン(prochymosin)と融合化させることにより同様の効果を狙ったものもある(Chris Hought, Gregory D, Rajesh Subramanian, et al(1998) Biotechnology and Bioengineering 57, 1 :55-61)。同様の狙いから、抗菌蛋白質をグルタチオン-S-トランスフェラーゼ3(GST)と融合化させる方法(Kirill A Martemyanov, Alexander Spirin, Anatoly T Gudkov.(1996) Biotechnology Letters 18, 12 :1357-1362)や、抗菌蛋白質をセルロースバインディングドメイン(CBD)と融合化させる方法(Kevin L Piers, Melissa H Brown, et al (1993) Gene 134, 1 :7-13)、抗菌蛋白質をプロテインAと融合化させる方法(L. Zhang, T. Falla, M. Wu, et al(1998) Biochemical and Biophysical Res. Com. 247 :674-680)等が提案されている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】ところで、抗菌蛋白質

のうち重要な幾つかのものは、アミノ酸配列上にシステインが存在し、一定様式の分子内ジスルフィド結合の形成を活性型の条件とする塩基性の抗菌蛋白質である。その代表的な例示として、植物由来のチオニン、PRプロテイン、リビッドトランスファープロテイン、リボゾーム不活性化プロテインや、植物、昆虫又はヒト由来のディフェンシン等が挙げられる。

【0005】これらのタイプの塩基性抗菌蛋白質については、前記の宿主細胞に対する毒性や、宿主細胞内での分解と言う問題に加え、更に、抗菌蛋白質を正しい一定様式の分子内ジスルフィド結合を伴う活性型で取得することが難しいと言う問題がある。一般的に、真核細胞は小胞体等の細胞内小器官で蛋白質をリフォールディング（分子内ジスルフィド結合の誤った様式を正しい一定の様式に掛け変える）する機能を有するが、原核細胞にはかかる機能がない。

【0006】例えば、前記した各従来技術は、いずれも上記のようなタイプの塩基性抗菌蛋白質を対象としたものでなく、これらのタイプの塩基性抗菌蛋白質を活性型で取得するための方法を開示もしくは示唆しない。不活性型で取得された塩基性抗菌蛋白質に対して、シャペロン機能を有する蛋白質を *in vitro* で別途投与して活性型に変換させる手法も知られているが、高コストな方法であるため、実際にはほとんど利用されていない。

【0007】一方、抗菌蛋白質以外の機能性蛋白質の分野で、かつ原核生物を宿主とする発現系においては、一定様式の分子内ジスルフィド結合の形成を活性型の条件とする蛋白質を、リフォールディング機能を有する一定の蛋白質との融合体として発現させる手法が2、3提案されている。例えば特開平7-250685号公報では、一定の機能性蛋白質をチオレドキシンとの融合体として発現させる手法が提案され、特開平11-75879号公報では、機能性蛋白質をプロテインジスルフィドイソメラーゼとの融合体として発現させる手法が提案されている。しかし、これらの手法を抗菌蛋白質の発現系に応用して、仮に活性型の抗菌蛋白質を発現させることができたとしても、抗菌蛋白質が宿主細胞に対して毒性を発揮するため、有効量の抗菌蛋白質を取得できない。

【0008】以上の点から、原核生物を宿主とする発現系を用いて、一定様式の分子内ジスルフィド結合の形成を活性型の条件とする塩基性抗菌蛋白質を高効率に取得するためには、当該塩基性抗菌蛋白質が宿主細胞内においては不活性で細胞内分解も受けない状態で発現され、これを宿主細胞より採取した後は容易かつ低コストな操作により活性化できることが課題となる。本願発明は、この課題の解決を可能とする抗菌蛋白質の製造方法等を提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】（第1発明の構成）上記課題を解決するための本願第1発明（請求項1に記載の

発明）の構成は、一定様式の分子内ジスルフィド結合の形成を活性型の条件とする塩基性の抗菌蛋白質Aを、等電点がpH7未満でありシャペロン機能を有するパートナー蛋白質Bとの蛋白質融合体として原核細胞内で発現させ、これを採取した後、前記パートナー蛋白質Bの機能の利用を含む活性化工程によって前記抗菌蛋白質Aを活性型に変換する、抗菌蛋白質の製造方法である。

【0010】（第2発明の構成）上記課題を解決するための本願第2発明（請求項2に記載の発明）の構成は、前記第1発明に係る蛋白質融合体の発現を、前記蛋白質融合体をコードするDNAを発現可能に導入した原核細胞の培養によって行う、抗菌蛋白質の製造方法である。

【0011】（第3発明の構成）上記課題を解決するための本願第3発明（請求項3に記載の発明）の構成は、前記第1発明又は第2発明に係る抗菌蛋白質Aが、それぞれ植物由来のチオニン、PRプロテイン、リビッドトランスファープロテイン、リボゾーム不活性化プロテインのいずれか、あるいは植物、昆虫又はヒト由来のディフェンシンである、抗菌蛋白質の製造方法である。

【0012】（第4発明の構成）上記課題を解決するための本願第4発明（請求項4に記載の発明）の構成は、前記第1発明～第3発明のいずれかに係るパートナー蛋白質Bが以下の1）又は2）のいずれかである、蛋白質融合体である。

1）プロテインジスルフィドイソメラーゼ（以下、「PDI」と言う）又は植物由来のチオニンに対して塩基配列上の下流に存在するDNAによってコードされている酸性蛋白質。

2）チオレドキシン（以下、「Tx」と言う）又はシャペロン。

【0013】（第5発明の構成）上記課題を解決するための本願第5発明（請求項5に記載の発明）の構成は、前記第1発明～第3発明のいずれかに係るパートナー蛋白質Bが、少なくとも等電点がpH7未満である酸性パートナー蛋白質B1と、少なくともシャペロン機能を有するシャペロンパートナー蛋白質B2とからなる、抗菌蛋白質の製造方法である。

【0014】（第6発明の構成）上記課題を解決するための本願第6発明（請求項6に記載の発明）の構成は、一定様式の分子内ジスルフィド結合の形成を活性型の条件とする塩基性の抗菌蛋白質Aと、等電点がpH7未満でありシャペロン機能を有するパートナー蛋白質Bとの融合体であり、前記抗菌蛋白質Aとパートナー蛋白質Bとが酵素により切断可能なオリゴペプチド部分を介して一連のポリペプチド鎖として構成されている、蛋白質融合体である。

【0015】（第7発明の構成）上記課題を解決するための本願第7発明（請求項7に記載の発明）の構成は、一定様式の分子内ジスルフィド結合の形成を活性型の条件とする塩基性の抗菌蛋白質Aと、少なくとも等電点が

10

20

30

40

50

pH7未満である酸性パートナー蛋白質B1と、少なくともシャペロン機能を有するシャペロンパートナー蛋白質B2との融合体である、蛋白質融合体である。

【0016】(第8発明の構成)上記課題を解決するための本願第8発明(請求項8に記載の発明)の構成は、前記第7発明に係る酸性パートナー蛋白質B1がフミコラ・インソレンス(Fusicola insolens)由来のプロテインジスルフィドイソメラーゼのカルボキシ末端領域であり、前記シャペロンパートナー蛋白質B2がペプチジルプロリルシーストランスイソメラーゼである、蛋白質融合体である。

【0017】(第9発明の構成)上記課題を解決するための本願第9発明(請求項9に記載の発明)の構成は、一定様式の分子内ジスルフィド結合の形成を活性型の条件とする塩基性の抗菌蛋白質Aと共に蛋白質融合体を形成するために用いられる蛋白質であって、少なくとも等電点がpH7未満である酸性パートナー蛋白質B1と、少なくともシャペロン機能を有するシャペロンパートナー蛋白質B2とからなる、パートナー蛋白質である。

【0018】(第10発明の構成)上記課題を解決するための本願第10発明(請求項10に記載の発明)の構成は、前記第6発明～第8のいずれかに係る蛋白質融合体をコードする、DNAである。

【0019】(第11発明の構成)上記課題を解決するための本願第11発明(請求項11に記載の発明)の構成は、前記第10発明に係るDNAを発現可能に導入した原核細胞である、宿主細胞である。

【0020】

【発明の作用・効果】(第1発明の作用・効果)第1発明の抗菌蛋白質の製造方法によれば、塩基性の抗菌蛋白質Aは等電点がpH7未満であるパートナー蛋白質Bとの比較的高分子量の蛋白質融合体として発現されるので、宿主細胞内で分解されない。又、抗菌蛋白質Aは、原核細胞宿主内で、通常は誤った分子内ジスルフィド結合を伴う不活性型として発現されるが、例えば活性型として発現された場合でも、パートナー蛋白質Bとの融合によって毒性がマスキングされている。以上の点から、細胞分裂の速い原核細胞内において、抗菌蛋白質Aを大量に発現させることができる。

【0021】次に、蛋白質融合体を宿主細胞より採取した後、活性化工程によって抗菌蛋白質Aを活性型に変換するが、その際にシャペロン機能を有するパートナー蛋白質Bの機能を利用して抗菌蛋白質Aのリフォールディングを行うので、低コストで活性化できる。この活性化工程において、通常は抗菌蛋白質Aとパートナー蛋白質Bとを分離する操作も行う。しかし、その分離操作は蛋白質融合体の融合状態に応じて選択される簡単な操作であり、抗菌蛋白質Aを容易に活性化できる。

【0022】(第2発明の作用・効果)第2発明によって、第1発明に係る抗菌蛋白質の製造方法の代表的な実

施形態例が提供される。

【0023】(第3発明の作用・効果)第3発明によって、第1発明又は第2発明に係る、一定様式の分子内ジスルフィド結合の形成を活性型の条件とする塩基性の抗菌蛋白質Aの代表的な実施形態例が提供される。

【0024】(第4発明の作用・効果)第4発明によって、等電点がpH7未満でありシャペロン機能を有するパートナー蛋白質Bの代表的な例が提供される。その内でも、PDI又は植物由来のチオニン下流にコードされる酸性蛋白質が、抗菌蛋白質Aのジスルフィド結合に対するリフォールディング機能において特に優れる。

【0025】(第5発明の作用・効果)蛋白質融合体におけるパートナー蛋白質Bは、第5発明のように酸性パートナー蛋白質B1とシャペロンパートナー蛋白質B2とからなっているとしても良い。この場合、蛋白質融合体は、抗菌蛋白質Aと、酸性パートナー蛋白質B1と、シャペロンパートナー蛋白質B2との3種類の蛋白質が融合されている。

【0026】(第6発明の作用・効果)抗菌蛋白質Aとパートナー蛋白質Bとの蛋白質融合体は両者の電気的親和力により融合していても良いが、第6発明のように両者が一連のポリペプチド鎖として構成されていると、宿主細胞内で発現された両者が確実に蛋白質融合体を形成する。しかも両者の蛋白質間には酵素により切断可能なオリゴペプチド部分が介在するので、活性化工程においては、この部分の酵素的切断により両者の蛋白質を容易に分離できる。

【0027】(第7発明の作用・効果)第7発明により、第6発明とは異なるタイプの蛋白質融合体例が提供される。この蛋白質融合体においては、酸性パートナー蛋白質B1とシャペロンパートナー蛋白質B2とがパートナー蛋白質Bの前記役割を分担する。

【0028】(第8発明の作用・効果)第8発明により、少なくとも等電点がpH7未満である酸性パートナー蛋白質B1の代表的な例と、少なくともシャペロン機能を有するシャペロンパートナー蛋白質B2の代表的な例とを含む蛋白質融合体が提供される。

【0029】(第9発明の作用・効果)第9発明によって、第7発明又は第8発明の蛋白質融合体における抗菌蛋白質Aのパートナーとなるべきパートナー蛋白質が提供される。

【0030】(第10発明の作用・効果)第10発明により、第6発明～第8発明に係る蛋白質融合体の遺伝子工学的な具体的生産手段が提供される。

【0031】(第11発明の作用・効果)第11発明により、第10発明のDNAを利用した蛋白質融合体の具体的な発現の場が提供される。

【0032】

【発明の実施の形態】次に、第1発明～第11発明の実施の形態について説明する。以下において単に「本発

明」と言うときは、第1発明～第11発明を一括して指している。

【0033】〔蛋白質融合体〕本発明に係る蛋白質融合体は、抗菌蛋白質Aとパートナー蛋白質Bとの融合体である。ここに「融合」とは、二種以上の異種蛋白質の一部あるいは全部が何らかの力によって一体化している状態を言う。「融合」の例として、抗菌蛋白質Aとパートナー蛋白質Bとが化学的に結合している融合形態を例示できる。この融合形態は、抗菌蛋白質Aとパートナー蛋白質Bとが切断可能なオリゴペプチド部分を介して一連のポリペプチド鎖として構成されている場合を含む。抗菌蛋白質Aとパートナー蛋白質Bとの一部あるいは全部が疎水性親和力や電気的性質等によって会合している融合形態等も例示できる。いずれの場合においても、抗菌蛋白質Aがアミノ酸配列上にシステインが存在する塩基性蛋白質であり、パートナー蛋白質Bが等電点がpH7未満であるため、両者が確実に融合する。

【0034】〔抗菌蛋白質A〕本発明に係る抗菌蛋白質Aは、アミノ酸配列上にシステインが存在し、一定様式の分子内ジスルフィド結合の形成を抗菌活性型の条件とする塩基性の抗菌蛋白質である。本発明に係る蛋白質融合体を構成している抗菌蛋白質Aの存在状態としては、元々誤った様式のジスルフィド結合の形成を伴って、不活性型として発現しているケースが例示される。正しい様式の分子内ジスルフィド結合の形成により活性型の立体構造を取っているが、パートナー蛋白質Bとの融合により電荷が中和され又は不溶化しているために毒性がマスキングされているケースも例示される。パートナー蛋白質Bとの融合によって抗菌活性型の条件であるジスルフィド結合を形成できないために、無毒化されているケースも例示される。

【0035】抗菌蛋白質Aの種類は、一定様式の分子内ジスルフィド結合の形成を抗菌活性型の条件とし、かつ塩基性の抗菌蛋白質である限りにおいて限定されない。しかし、それぞれ植物由来のチオニン、PRプロテイン、リビッドトランスファープロテイン、リボゾーム不活性化プロテインのいずれか、あるいは植物、昆虫又はヒト由来のディフェンシン等を特に好ましく例示することができる。上記植物由来のチオニンとしては、例えば

大麦由来のもの、更に具体的には配列番号1に示すアミノ酸配列中の10位～54位のアミノ酸からなるものが好ましく例示される。

【0036】〔パートナー蛋白質B〕本発明に係るパートナー蛋白質Bは、等電点がpH7未満でありシャペロン機能を有する蛋白質である。ここに「シャペロン機能」とは、対象とする蛋白質の立体構造を正しく変更させ得る機能を言い、本発明においては特に、蛋白質の分子内ジスルフィド結合の形成部位を活性型として正しい状態に変更させるリフォールディング機能が好ましい。上記等電点としても、pH6以下のもの、とりわけpH

5.5以下のものが好ましい。又、パートナー蛋白質Bは、単一のパートナー蛋白質からなる場合と、酸性パートナー蛋白質B1及びシャペロンパートナー蛋白質B2からなる場合とがある。

【0037】パートナー蛋白質Bの種類は上記の規定に合致する限りにおいて限定されない。しかし、単一のパートナー蛋白質Bとしては、PDI（等電点pH4.68）又は植物由来のチオニンに対して塩基配列上の下流に存在するDNAによってコードされている酸性蛋白質（等電点pH3.61）を特に好ましく例示することができる。

【0038】上記PDIとしては、例えば前記フミコラ・インソレンス由来のもの、更に具体的には配列番号2に示すアミノ酸配列中の59位～543位のアミノ酸からなるものが好ましく例示される。上記酸性蛋白質としては、大麦由来のチオニンに対して塩基配列上の下流に存在するDNAによってコードされている酸性蛋白質、更に具体的には配列番号1に示すアミノ酸配列中の61位～124位のアミノ酸からなるものが好ましく例示される。

【0039】単一のパートナー蛋白質Bとしては、その他にもTx（等電点pH5.14）を好ましく例示できる。更に、GroEL（等電点pH5.08）、GroES（等電点pH4.51）、HSP90（等電点pH4.67）等のシャペロニンも、好ましく例示できる。

【0040】上記酸性パートナー蛋白質B1としては、フミコラ・インソレンス由来のPDIのカルボキシル末端である514位のグルタミン酸～543位のロイシンの領域（等電点pH3.95）を例示できるが、その他の等電点が酸性域に存する任意の蛋白質でも構わない。上記シャペロンパートナー蛋白質B2としてはPPIを好ましく例示できる。シャペロンパートナー蛋白質B2の等電点は限定されないが、その等電点が酸性域にない場合には、宿主細胞における発現の際に抗菌蛋白質Aと融合するための任意の手段（例えば、酵素的に切断可能なオリゴペプチド部分を介して抗菌蛋白質Aと一連のポリペプチド鎖として構成されている）を施すことが好ましい。

【0041】〔蛋白質融合体をコードするDNA〕本発明の抗菌蛋白質の製造方法においては、前記したいずれかの蛋白質融合体をコードするDNAを原核細胞である宿主細胞に発現可能に導入して、蛋白質融合体を効率良く大量生産することができる。これらのDNAは、上記抗菌蛋白質Aとパートナー蛋白質Bとをコーディングしている限りにおいて、その具体的な塩基配列を限定しない。

【0042】上記コーディングの態様として、単一の構造遺伝子として抗菌蛋白質Aとパートナー蛋白質B（又は、酸性パートナー蛋白質B1及びシャペロンパートナー蛋白質B2）とを連続してコードしている場合があり

10

20

30

40

50

得る。単一の構造遺伝子として抗菌蛋白質 A と、任意の手段によって切断可能な中間オリゴペプチド部分と、パートナー蛋白質 B (又は、酸性パートナー蛋白質 B 1 及びシャペロンパートナー蛋白質 B 2) とを連続してコードしている場合もあり得る。抗菌蛋白質 A とパートナー蛋白質 B とを、あるいは抗菌蛋白質 A、酸性パートナー蛋白質 B 1、シャペロンパートナー蛋白質 B 2 の内の二者以上を、適宜な介在配列を介することにより、異なる構造遺伝子としてコードしている場合もあり得る。かかる DNA としては、例えば配列番号 1 又は配列番号 2 に示す塩基配列からなるものを、それぞれ特に好ましく例示できる。

【0043】〔DNA を発現可能に導入した宿主細胞〕上記 DNA は、一般論としては、任意の適宜な宿主細胞に発現可能に導入することができ、宿主細胞の種類は限定されない。例えば、大腸菌等のような原核細胞、酵母等のような真核細胞のほか、任意の種類の植物細胞や非ヒト動物細胞を利用できる。しかし本発明においては、原核細胞を宿主とする。

【0044】DNA を宿主細胞に発現可能に導入するためには、適当な任意の発現ベクターを利用できる。特に好ましく利用可能な発現ベクターとして、例えば大腸菌用には Novagen 社製の「pET Expression system」等のプラスミドを例示できる。発現ベクターへの DNA の挿入や、宿主細胞への発現ベクターの導入は、公知の任意の方法により行うことができる。

【0045】〔抗菌蛋白質の製造方法〕抗菌蛋白質の製造方法は、蛋白質融合体の製造過程を含む。この過程は、例えば上記所定の DNA を発現可能に導入した宿主細胞を培養するものである。宿主細胞の培養方法や培養条件は限定されない。

【0046】製造した蛋白質融合体を宿主細胞から採取する際の採取方法や精製方法等については、必要に応じて任意の手法を採用すれば良い。本発明に係る蛋白質融合体は、その保存方法や保存条件によっては、抗菌蛋白質 A よりも保存性が優れる場合がある。従って抗菌蛋白質の製造方法を完了に到るまで実施せず、蛋白質融合体の保存、流通等を目的として蛋白質融合体の製造及び採取までの過程のみを実施する場合があり得る。蛋白質融合体の「採取」とは、クルードな状態での採取もあり得るし、精製状態での採取もあり得る。

【0047】抗菌蛋白質の製造方法は、少なくともパートナー蛋白質 B の機能を利用して抗菌蛋白質 A を抗菌活性型に変換する過程を含むが、通常は蛋白質融合体における抗菌蛋白質 A をパートナー蛋白質 B から分離する過程も含む。上記の両過程は同時に進行する場合もあるし、順次経時的に進行する場合もある。

【0048】抗菌蛋白質 A をパートナー蛋白質 B から分離する過程は、両者が一連のポリペプチド鎖によって構成されている場合には、その境界部 (又は境界部に介在

させた切断用のオリゴペプチド部分) におけるペプチド結合を切断する操作を伴う。両者が別個のポリペプチド鎖によって構成され電気的性質等により会合している場合には、これらを分離させる適宜な処理を伴う。

【0049】抗菌蛋白質 A を抗菌活性型に変換する過程は、パートナー蛋白質 B の機能によって自動的に進行し完了することを期待できる。但し、この過程の促進のために、その他の任意のジスルフィド結合リフォールディング操作を並行して行っても良い。

【0050】

【発明の好ましい実施態様】本発明は、以下の実施態様において好ましく実施することができる。なお、本項において、「上記」と言うときは、該当する内容の先行する番号の実施態様の全てを、いずれも択一的に選択可能に指している。

(1) 一定様式の分子内ジスルフィド結合の形成を活性型の条件とする塩基性の抗菌蛋白質 A を、等電点が pH 7 未満でありシャペロン機能を有するパートナー蛋白質 B との蛋白質融合体として原核細胞内で発現させ、これを取り出した後、前記パートナー蛋白質 B の機能の利用を含む活性化工程によって前記抗菌蛋白質 A を活性型に変換する抗菌蛋白質の製造方法。

(2) 上記蛋白質融合体において、抗菌蛋白質 A とパートナー蛋白質 B とが化学的に結合している。

(3) 上記蛋白質融合体において、抗菌蛋白質 A とパートナー蛋白質 B とが、酵素によって切断可能なオリゴペプチド部分を介して、一連のポリペプチド鎖として構成されている。

(4) 上記蛋白質融合体において、抗菌蛋白質 A とパートナー蛋白質 B との一部あるいは全部が疎水性親和力又は電気的性質によって会合している。

(5) 上記抗菌蛋白質 A が、それぞれ植物由来のチオニン、PR プロテイン、リビッドトランスフェープロテイン、リボゾーム不活性化プロテインのいずれか、あるいは植物、昆虫又はヒト由来のディフェンシンである。

(6) 上記植物由来のチオニンが大麦由来のものである。

(7) 上記植物由来のチオニンが、配列番号 1 に示すアミノ酸配列中の 10 位～54 位のアミノ酸からなるものである。

(8) 上記パートナー蛋白質 B の等電点が pH 6 以下、とりわけ pH 5.5 以下である。

(9) 上記パートナー蛋白質 B のシャペロン機能が、蛋白質の分子内ジスルフィド結合の形成部位を活性型としての正しい状態に変更させるリフォールディング機能である。

(10) 上記パートナー蛋白質 B が PDI 又は植物由来のチオニンに対して塩基配列上の下流に存在する DNA によってコードされている酸性蛋白質である。

(11) 上記 PDI が、フミコラ・インソレンス由来の

10

20

30

40

50



PDI、更に具体的には配列番号2に示すアミノ酸配列中の59位～543位のアミノ酸からなるPDIである。

(12) 上記酸性蛋白質が大麦由来の酸性蛋白質、更に具体的には配列番号1に示すアミノ酸配列中の61位～124位のアミノ酸からなる酸性蛋白質である。

(13) 上記パートナー蛋白質BがTx又はシャペロンである。

(14) 上記パートナー蛋白質Bが、少なくとも等電点がpH7未満である酸性パートナー蛋白質B1と、少なくともシャペロン機能を有するシャペロンパートナー蛋白質B2とからなる。

(15) 上記酸性パートナー蛋白質B1がフミコラ・インソレンス由来のPDIのカルボキシル末端の所定領域である。

(16) 上記シャペロンパートナー蛋白質B2がPPIである。

(17) 上記抗菌蛋白質Aと共に蛋白質融合体を形成するために用いられる蛋白質であって、上記酸性パートナー蛋白質B1とシャペロンパートナー蛋白質B2とからなるパートナー蛋白質。

(18) 上記いずれかの蛋白質融合体をコードするDNA。

(19) 上記DNAが、単一の構造遺伝子として抗菌蛋白質Aとパートナー蛋白質B（又は、酸性パートナー蛋白質B1及びシャペロンパートナー蛋白質B2）とを連続してコードしている。

(20) 上記DNAが、単一の構造遺伝子として、抗菌蛋白質Aと、任意の手段によって切断可能な中間オリゴペプチド部分と、パートナー蛋白質B（又は、酸性パートナー蛋白質B1及びシャペロンパートナー蛋白質B2）とを連続してコードしている。

(21) 上記DNAが、抗菌蛋白質Aとパートナー蛋白質Bとを、あるいは抗菌蛋白質A、酸性パートナー蛋白質B1、シャペロンパートナー蛋白質B2の内、抗菌蛋白質Aを含む二者以上を、任意の介在配列を介することにより、異なる構造遺伝子としてコードしている。

(22) 上記DNAが、配列番号1又は配列番号2に示す塩基配列からなる。

(23) 上記DNAが、配列番号1又は配列番号2に示す塩基配列からなるDNAに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、かつ、抗菌蛋白質A、パートナー蛋白質B、酸性パートナー蛋白質B1、シャペロンパートナー蛋白質B2の内、抗菌蛋白質Aを含む二者以上をコードしている。

(24) 上記DNAを発現可能に導入した宿主細胞。

(25) 上記宿主細胞が原核細胞である。

(26) 上記宿主細胞を培養して、上記いずれかの蛋白質融合体を採取する蛋白質融合体の製造過程。

(27) 上記蛋白質融合体を保存又は流通に供する。

(28) 上記いずれかの蛋白質融合体における抗菌蛋白質Aをパートナー蛋白質Bから分離する過程と、前記抗菌蛋白質Aを前記パートナー蛋白質Bの機能によって抗菌活性型に変換する過程とを含む抗菌蛋白質の製造方法。

(29) 上記抗菌蛋白質Aをパートナー蛋白質Bから分離する過程が、両者の境界部（又は境界部に介在させた切断用のオリゴペプチド部分）におけるペプチド結合を切断する操作を伴う。

(30) 上記抗菌蛋白質Aを抗菌活性型に変換する過程が、その過程の促進のための通常ジスルフィド結合リフォールディング操作を伴う。

【0051】

【実施例1：チオニン-酸性蛋白質融合体遺伝子の構築】大麦由来のチオニンと、大麦由来のチオニンに対し塩基配列上の下流に存在するDNAによってコードされている酸性蛋白質との融合体をコードする遺伝子を作成し、Novagen社製のプラスミド pET-19bにおける制限酵素Nde1-BamH1切断部位間に挿入してクローニングを行った。

【0052】大麦由来のチオニン遺伝子は配列番号1における第28位～第162位の塩基配列を有し、上記酸性蛋白質の遺伝子は配列番号1における第181位～第372位の塩基配列を有する。配列番号1において、第7位～第12位のCATATGの塩基配列は制限酵素Nde1による切断領域であり、第378位～第383位のGGATCCの塩基配列は制限酵素BamH1による切断領域である。併記するアミノ酸配列において、第5位～第8位及び第56位～第59位の Thr-Glu-Gly-Argのアミノ酸配列は、プロテアーゼである Factor Xaの認識部位である。

【0053】（実施例2：チオニン-PDI融合体遺伝子の構築）大麦由来のチオニンと、フミコラ・インソレンス由来のPDIとの蛋白質融合体をコードする遺伝子を作成し、これをNovagen社製のプラスミド pET-19bにおける制限酵素Nde1-BamH1切断部位間に挿入してクローニングを行った。

【0054】大麦由来のチオニン遺伝子は配列番号2における第25位～第159位の塩基配列を有する。上記PDIの遺伝子は配列番号2における第175位～第1629位の塩基配列を有する。配列番号2において、第7位～第12位のCATATGの塩基配列は制限酵素Nde1による切断領域であり、第1635位～第1640位のGGATCCの塩基配列は制限酵素BamH1による切断領域である。一方、併記するアミノ酸配列において、第5位～第8位及び第55位～第58位の Thr-Glu-Gly-Argのアミノ酸配列は Factor Xaの認識部位である。

【0055】（比較例1：チオニン遺伝子の構築）大麦由来のチオニンをコードする遺伝子をNovagen社製のプラスミド pET-19bにおける制限酵素Nde1-BamH1切断部位間に挿入してクローニングを行った。



【0056】大麦由来のチオニン遺伝子は配列番号3における第28位～第162位の塩基配列を有する。配列番号3において、第7位～第12位のCATATGの塩基配列は制限酵素NdeIによる切断領域であり、第168位～第173位のGGATCCの塩基配列は制限酵素BamHIによる切断領域である。一方、併記するアミノ酸配列において、第5位～第8位のThr-Glu-Gly-Argのアミノ酸配列はFactor Xaの認識部位である。

【0057】(比較例2:チオニン-PDI酸性領域融合体遺伝子の構築)フミコラ・インソレンス由来のPDIのカルボキシル末端には、酸性アミノ酸の多い酸性領域が存在する。大麦由来のチオニンと、上記酸性領域との蛋白質融合体をコードする遺伝子を作成し、これをNovagen社製のプラスミドpET-19bにおける制限酵素NdeI-BamHI切断部位間に挿入してクローニングを行った。

【0058】上記酸性領域は、PDIの活性部位が含まれていないため、ジスルフィド結合をリフォールディングする触媒作用を備えていないものと思われる。

【0059】大麦由来のチオニン遺伝子は配列番号4における第25位～第159位の塩基配列を有し、上記酸性領域の遺伝子は第175位～第264位の塩基配列を有する。配列番号4において、第7位～第12位のCATATGの塩基配列は制限酵素NdeIによる切断領域であり、第270位～第275位のGGATCCの塩基配列は制限酵素BamHIによる切断領域である。併記するアミノ酸配列において、第5位～第8位及び第35位～第38位のThr-Glu-Gly-Argのアミノ酸配列はFactor Xaの認識部位である。

【0060】(遺伝子の大腸菌内での発現)実施例1、実施例2、比較例1及び比較例2で構築されたベクターを用いて、それぞれ大腸菌BL21(DE3)pLysSに形質転換した。取得したそれぞれの形質転換株をLB培地(bacto-o-tryptone 1%, bacto-yeast extract 0.5%, NaCl 1%)で37°Cにて一晩培養し、これをLB培地に1%植菌した。そして37°CでOD=0.5まで培養し、IPTG(isopropylthio-β-D-galactoside)を最終濃度1mMになるように添加して、誘導発現を6時間行った。

【0061】その後、培養液を遠心分離により集菌し、湿菌体重量の10倍のSonicationバッファーを加えて懸濁した。超音波により菌体を破碎した後、15000rpmで30分の遠心分離を行い、上清を可溶性画分、沈殿を不溶性画分とした。

【0062】これらをSDS-PAGEに供した結果、比較例1に係るチオニンは発現しなかったが、他の実施例及び比較例に係る蛋白質融合体はいずれも不溶性画分に発現を認めた。

【0063】(蛋白質融合体の回収)上記において発現を認めた実施例1、実施例2及び比較例2に係る蛋白質融合体の不溶性画分と、抗菌活性測定時のコントロール

とするベクター非導入の大腸菌BL21(DE3)pLysSの培養に係る不溶性画分とを、0.5% TritonX-100/1mM DTA溶液で2回洗浄した後、尿素溶液(8M尿素、50mM Tris-HCl pH8.0、1mM DTT、1mM EDTA)を加えて可溶化した。遠心分離の後、上清を透析チューブに移し、4M尿素溶液に対して4°Cで1時間透析を行った。上記DTTを含む尿素溶液での透析時、チオニンのジスルフィド結合が切断されていると考えられる。

【0064】その後透析外液を2M尿素溶液、プロテアーゼ切断に供するためのバッファー(50mM Tris-HCl pH8.0、100mM NaCl、1mM 塩化カルシウム)に順次交換した後、後者のバッファーにて一晩透析を行った。この透析時、チオニンのジスルフィド結合がリフォールディングされていると考えられる。透析終了後、遠心分離して上清を後述のFactor Xaによる切断に用いた。

【0065】上述の操作中に、チオニンとPDIとの蛋白質融合体又はチオニンと酸性蛋白質との蛋白質融合体(実施例1又は実施例2)においては、透析自体によるチオニンのリフォールディング効果に加え、PDI又は酸性蛋白質によるリフォールディング効率の向上を期待できる。

【0066】(プロテアーゼによる蛋白質融合体の切断)上記のように透析を行った実施例1、実施例2及び比較例2に係る蛋白質融合体はそれぞれ、前記配列番号1、配列番号2又は配列番号4に示すように、チオニンとそのパートナー蛋白質との間に、プロテアーゼであるFactor Xaの認識配列を保持している。そこで、上記の各蛋白質融合体1mgに対して、Factor Xa30μgを用いて、30°Cにて一晩、Factor Xaによる切断に供した。

【0067】(抗菌活性の測定)上記の切断操作により得られた蛋白質溶液を、限外濾過膜を利用した濃縮ユニットであるMicrocon-3(MWCO:3000)を用いて30μLに濃縮した。このような多数の濃縮サンプル液30μLをそれぞれ96穴マイクロプレートの各ウエルに注入し、更に各ウエルに対してpH6の200mM MES(2-(N-morpholino)エタンスルホン酸)バッファー10μL、サツマイモ黒斑病菌(Ceratocystis fimbriata:IF030501)の分生孢子懸濁液(孢子数1mL当たり10万:80%ポテトデキストロースブロス)60μLを加え、26°Cで培養した。別途、コントロールとして前記ベクター非導入の大腸菌の培養に係る不溶性画分についても同上の操作を行った。

【0068】そしてModel3550マイクロプレートリーダーを用いて30分後及び48時間後の吸光度(415nm)を測定した。発育阻害率を、次の式1により求めた。なお、式1において、Aはサンプル液における上記48時間後の吸光度の測定値から上記30分後の吸光度の測定値を差引いた値を表し、Bはサンプルを含まない溶液における上記48時間後の吸光度の測定値から上記30分

10

20

30

40

50

後の吸光度の測定値を差引いた値を表す。

\* \* 【0069】

発育阻害率(%) = (B - A) × 100 / B ..... 式1

その結果、コントロールの発育阻害率は9.6%であった。そして比較例2は発育阻害率が11.5%であり、実質的に抗菌活性が認められなかった。実施例1は発育阻害率が99.8%、実施例2は発育阻害率が99.1%であり、高い抗菌活性が認められた。比較例2と、実

※ 施例1及び実施例2との上記のような差異は、パートナー蛋白質による前記リフォールディング効率の向上効果の有無に起因すると考えることができる。

【0070】

【配列表】

# SEQUENCE LISTING

<110> KABUSHIKI KAISHA TOYOTA CHUO KENKYUSHO

<120> 抗菌蛋白質の製造方法、蛋白質融合体

<130> POK-01-029

<160> 4

<210> 1

<211> 392

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<400> 1

```

gac aag cat atg att gaa ggt cgt atg aaa agc tgc tgc cgt agc acc      48
Asp Lys His Met Ile Glu Gly Arg Met Lys Ser Cys Cys Arg Ser Thr
                    5              10              15

ctg ggt cgt aac tgc tat aac ctg tgc cgt gtt cgt ggt gcg cag aaa      96
Leu Gly Arg Asn Cys Tyr Asn Leu Cys Arg Val Arg Gly Ala Gln Lys
                    20              25              30

ctg tgc gcg ggt gtt tgc cgt tgc aaa ctg acc agc agc ggt aaa tgc      144
Leu Cys Ala Gly Val Cys Arg Cys Lys Leu Thr Ser Ser Gly Lys Cys
                    35              40              45

ccg acc ggt ttt ccg aaa atg att gaa ggt cgt acg ctg gcg ctg gtt      192
Pro Thr Gly Phe Pro Lys Met Ile Glu Gly Arg Thr Leu Ala Leu Val
                    50              55              60

agc aac agc gat gaa ccg gat acc gtt aaa tat tgc aac ctg ggt tgc      240
Ser Asn Ser Asp Glu Pro Asp Thr Val Lys Tyr Cys Asn Leu Gly Cys
                    65              70              75              80

cgt gcg agc atg tgc gat tat atg gtt aac gcg gcg gcg gat gat gaa      288
Arg Ala Ser Met Cys Asp Tyr Met Val Asn Ala Ala Ala Asp Asp Glu
                    85              90              95

gaa atg aaa ctg tat ctg gaa aac tgc ggt gat gcg tgc gtt aac ttt      336
Glu Met Lys Leu Tyr Leu Glu Asn Cys Gly Asp Ala Cys Val Asn Phe
                    100             105             110

tgc aac ggt gat gcg ggt ctg acc agc ctg acc gcg tga tag gat ccg      384
Cys Asn Gly Asp Ala Gly Leu Thr Ser Leu Thr Ala *** *** Asp Pro
                    115             120             125

gct gct aa                                                              392
Ala Ala
                    130

<210> 2
<211> 1649
<212> DNA
<213> Hordeum vulgare
<400> 2

```

| 17  | 18  |
|---|-----|
| gac aag cat atg att gaa ggt cgt aaa agc tgc tgc cgt agc acc ctg | 48  |
| Asp Lys His Met Ile Glu Gly Arg Lys Ser Cys Cys Arg Ser Thr Leu |     |
| 5 10 15   |     |
| ggt cgt aac tgc tat aac ctg tgc cgt gtt cgt ggt gcg caa aaa ctg | 96  |
| Gly Arg Asn Cys Tyr Asn Leu Cys Arg Val Arg Gly Ala Gln Lys Leu |     |
| 20 25 30  |     |
| tgc gcg ggt gtt tgc cgt tgc aaa ctg acc agc agc ggt aaa tgc ccg | 144 |
| Cys Ala Gly Val Cys Arg Cys Lys Leu Thr Ser Ser Gly Lys Cys Pro |     |
| 35 40 45  |     |
| acc ggt ttt ccg aaa atg att gaa ggt cgt tcg gat gtt gtc caa ctg | 192 |
| Thr Gly Phe Pro Lys Met Ile Glu Gly Arg Ser Asp Val Val Gln Leu |     |
| 50 55 60  |     |
| aag aag gac acc ttc gac gac ttc atc aag acg aat gac ctt gtt ctc | 240 |
| Lys Lys Asp Thr Phe Asp Asp Phe Ile Lys Thr Asn Asp Leu Val Leu |     |
| 65 70 75 80   |     |
| gcc gaa ttc ttc gcg ccg tgg tgc ggt cac tgc aag gct ctc gcc ccc | 288 |
| Ala Glu Phe Phe Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys Ala Leu Ala Pro |     |
| 85 90 95  |     |
| gag tac gag gag gct gcg acc aca ctg aag gag aag aac atc aag ctc | 336 |
| Glu Tyr Glu Glu Ala Ala Thr Thr Leu Lys Glu Lys Asn Ile Lys Leu |     |
| 100 105 110   |     |
| gcc aag gtg gac tgc aca gag gag acg gac ctc tgc caa caa cat ggt | 384 |
| Ala Lys Val Asp Cys Thr Glu Glu Thr Asp Leu Cys Gln Gln His Gly |     |
| 115 120 125   |     |
| gtt gag ggc tac ccg act ctc aag gtc ttc cgc ggc ctt gac aac gtc | 432 |
| Val Glu Gly Tyr Pro Thr Leu Lys Val Phe Arg Gly Leu Asp Asn Val |     |
| 130 135 140   |     |
| tcc ccc tac aag ggc caa cgc aag gct gct gct atc acc tcg tac atg | 480 |
| Ser Pro Tyr Lys Gly Gln Arg Lys Ala Ala Ala Ile Thr Ser Tyr Met |     |
| 145 150 155 160   |     |
| atc aag caa tct ctg ccc gcc gtg tcc gag gtc acg aag gac aac ctg | 528 |
| Ile Lys Gln Ser Leu Pro Ala Val Ser Glu Val Thr Lys Asp Asn Leu |     |
| 165 170 175   |     |
| gag gag ttc aag aag gcc gac aag gcc gtc ctt gtc gcc tat gtg gat | 576 |
| Glu Glu Phe Lys Lys Ala Asp Lys Ala Val Leu Val Ala Tyr Val Asp |     |
| 180 185 190   |     |
| gct tcc gac aag gcg tcc agt gag gtt ttc acc caa gtc gcc gag aag | 624 |
| Ala Ser Asp Lys Ala Ser Ser Glu Val Phe Thr Gln Val Ala Glu Lys |     |
| 195 200 205   |     |
| ctg cgc gac aac tac ccg ttc gcc tcc agc agc gat gct gcg ctg gcc | 672 |
| Leu Arg Asp Asn Tyr Pro Phe Gly Ser Ser Ser Asp Ala Ala Leu Ala |     |
| 210 215 220   |     |
| gag gct gag ggc gtc aag gct ccc gct atc gtc ctt tac aag gac ttt | 720 |
| Glu Ala Glu Gly Val Lys Ala Pro Ala Ile Val Leu Tyr Lys Asp Phe |     |
| 225 230 235 240   |     |
| gat gag ggc aag gcg gtc ttc tcc gag aag ttc gag gtg gag gcg atc | 768 |
| Asp Glu Gly Lys Ala Val Phe Ser Glu Lys Phe Glu Val Glu Ala Ile |     |
| 245 250 255   |     |
| gag aag ttc gcc aag acg ggc gcc acc ccg ctc att ggc gag att ggc | 816 |

| 19  |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 20  |     |     |     |     |     |      |  |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|--|--|--|
| Glu | Lys | Phe | Ala | Lys | Thr | Gly | Ala | Thr | Pro | Leu | Ile | Gly | Glu | Ile | Gly |      |  |  |  |
| 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |     |     |     |      |  |  |  |
| ccc | gaa | acc | tac | tcc | gac | tac | atg | tcg | gcc | ggc | atc | cct | ctg | gcc | tac | 864  |  |  |  |
| Pro | Glu | Thr | Tyr | Ser | Asp | Tyr | Met | Ser | Ala | Gly | Ile | Pro | Leu | Ala | Tyr |      |  |  |  |
| 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |     |     |      |  |  |  |
| att | ttc | gcc | gaa | acg | gcc | gag | gag | cgg | aag | gag | ctc | agc | gac | aag | ctc | 912  |  |  |  |
| Ile | Phe | Ala | Glu | Thr | Ala | Glu | Glu | Arg | Lys | Glu | Leu | Ser | Asp | Lys | Leu |      |  |  |  |
| 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |     |      |  |  |  |
| aag | ccg | atc | gcc | gag | gct | cag | cgc | ggc | gtc | att | aac | ttt | ggt | act | att | 960  |  |  |  |
| Lys | Pro | Ile | Ala | Glu | Ala | Gln | Arg | Gly | Val | Ile | Asn | Phe | Gly | Thr | Ile |      |  |  |  |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |      |  |  |  |
| gac | gcc | aag | gct | ttt | ggt | gcc | cac | gcc | ggc | aac | ctg | aac | ctg | aag | acc | 1008 |  |  |  |
| Asp | Ala | Lys | Ala | Phe | Gly | Ala | His | Ala | Gly | Asn | Leu | Asn | Leu | Lys | Thr |      |  |  |  |
| 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |     |     |     |     |      |  |  |  |
| gac | aag | ttc | ccc | gcc | ttc | gcc | atc | cag | gag | gtc | gcc | aag | aac | cag | aag | 1056 |  |  |  |
| Asp | Lys | Phe | Pro | Ala | Phe | Ala | Ile | Gln | Glu | Val | Ala | Lys | Asn | Gln | Lys |      |  |  |  |
| 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |     |     |     |      |  |  |  |
| ttc | ccc | ttc | gat | cag | gag | aag | gag | atc | acc | ttc | gag | gcg | atc | aag | gct | 1104 |  |  |  |
| Phe | Pro | Phe | Asp | Gln | Glu | Lys | Glu | Ile | Thr | Phe | Glu | Ala | Ile | Lys | Ala |      |  |  |  |
| 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |     |     |      |  |  |  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |  |  |
| ttc | gtc | gac | gac | ttt | gtc | gcc | ggt | aag | atc | gag | ccc | agc | atc | aag | tcg | 1152 |  |  |  |
| Phe | Val | Asp | Asp | Phe | Val | Ala | Gly | Lys | Ile | Glu | Pro | Ser | Ile | Lys | Ser |      |  |  |  |
| 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |     |      |  |  |  |
| gag | ccg | atc | cct | gag | aag | cag | gag | ggc | ccc | gtc | acc | gtc | gtc | gtt | gcc | 1200 |  |  |  |
| Glu | Pro | Ile | Pro | Glu | Lys | Gln | Glu | Gly | Pro | Val | Thr | Val | Val | Val | Ala |      |  |  |  |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |      |  |  |  |
| aag | aac | tac | aat | gag | atc | gtc | ctg | gac | gac | acc | aag | gat | gtg | ctg | att | 1248 |  |  |  |
| Lys | Asn | Tyr | Asn | Glu | Ile | Val | Leu | Asp | Asp | Thr | Lys | Asp | Val | Leu | Ile |      |  |  |  |
| 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |     |     |     |     |      |  |  |  |
| gag | ttc | tac | gcc | ccg | tgg | tgc | ggc | cac | tgc | aag | gcc | ctg | gct | ccc | aag | 1296 |  |  |  |
| Glu | Phe | Tyr | Ala | Pro | Trp | Cys | Gly | His | Cys | Lys | Ala | Leu | Ala | Pro | Lys |      |  |  |  |
| 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |     |     |     |      |  |  |  |
| tac | gag | gag | ctc | ggc | gcc | ctg | tat | gcc | aag | agc | gag | ttc | aag | gac | ccg | 1344 |  |  |  |
| Tyr | Glu | Glu | Leu | Gly | Ala | Leu | Tyr | Ala | Lys | Ser | Glu | Phe | Lys | Asp | Arg |      |  |  |  |
| 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |     |     |      |  |  |  |
| gtc | gtc | atc | gcc | aag | gtt | gat | gcc | acg | gcc | aac | gac | gtt | ccc | gat | gag | 1392 |  |  |  |
| Val | Val | Ile | Ala | Lys | Val | Asp | Ala | Thr | Ala | Asn | Asp | Val | Pro | Asp | Glu |      |  |  |  |
| 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |     |      |  |  |  |
| atc | cag | gga | ttc | ccc | acc | atc | aag | ctg | tac | ccg | gcc | ggt | gcc | aag | ggt | 1440 |  |  |  |
| Ile | Gln | Gly | Phe | Pro | Thr | Ile | Lys | Leu | Tyr | Pro | Ala | Gly | Ala | Lys | Gly |      |  |  |  |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |      |  |  |  |
| cag | ccc | gtc | acc | tac | tct | ggc | tcg | cgc | act | gtc | gag | gac | ctc | atc | aag | 1488 |  |  |  |
| Gln | Pro | Val | Thr | Tyr | Ser | Gly | Ser | Arg | Thr | Val | Glu | Asp | Leu | Ile | Lys |      |  |  |  |
| 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |     |     |     |     |      |  |  |  |
| ttc | atc | gcc | gag | aac | ggc | aag | tac | aag | gcc | gcc | atc | tcg | gag | gat | gcc | 1536 |  |  |  |
| Phe | Ile | Ala | Glu | Asn | Gly | Lys | Tyr | Lys | Ala | Ala | Ile | Ser | Glu | Asp | Ala |      |  |  |  |
| 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |     |     |     |      |  |  |  |
| gag | gag | acg | tcg | tcc | gca | acc | gag | acg | acc | acc | gag | acg | gcc | acc | aag | 1584 |  |  |  |
| Glu | Glu | Thr | Ser | Ser | Ala | Thr | Glu | Thr | Thr | Thr | Glu | Thr | Ala | Thr | Lys |      |  |  |  |

21 22

515 520 525

tcg gag gag gct gcc aag gag acg gcg acg gag cac gac gag ctc tga 1632  
 Ser Glu Glu Ala Ala Lys Glu Thr Ala Thr Glu His Asp Glu Leu \*\*\*

530 535 540 543

tag gat ccg gct gct aa 1649  
 \*\*\* Asp Pro Ala Ala

545 549

<210> 3  
 <211> 182  
 <212> DNA  
 <213> Hordeum vulgare  
 <400> 3

gac aag cat atg att gaa ggt cgt atg aaa agc tgc tgc cgt agc acc 48  
 Asp Lys His Met Ile Glu Gly Arg Met Lys Ser Cys Cys Arg Ser Thr

5 10 15

ctg ggt cgt aac tgc tat aac ctg tgc cgt gtt cgt ggt gcg cag aaa 96  
 Leu Gly Arg Asn Cys Tyr Asn Leu Cys Arg Val Arg Gly Ala Gln Lys

20 25 30

ctg tgc gcg ggt gtt tgc cgt tgc aaa ctg acc agc agc ggt aaa tgc 144  
 Leu Cys Ala Gly Val Cys Arg Cys Lys Leu Thr Ser Ser Gly Lys Cys

35 40 45

ccg acc ggt ttt ccg aaa tga tag gat ccg gct gct aa 182  
 Pro Thr Gly Phe Pro Lys \*\*\* \*\*\* Asp Pro Ala Ala

50 55 60

<210> 4  
 <211> 284  
 <212> DNA  
 <213> Hordeum vulgare  
 <400> 4

gac aag cat atg att gaa ggt cgt aaa agc tgc tgc cgt agc acc ctg 48  
 Asp Lys His Met Ile Glu Gly Arg Lys Ser Cys Cys Arg Ser Thr Leu

5 10 15

ggt cgt aac tgc tat aac ctg tgc cgt gtt cgt ggt gcg cag aaa ctg 96  
 Gly Arg Asn Cys Tyr Asn Leu Cys Arg Val Arg Gly Ala Gln Lys Leu

20 25 30

tgc gcg ggt gtt tgc cgt tgc aaa ctg acc agc agc ggt aaa tgc ccg 144  
 Cys Ala Gly Val Cys Arg Cys Lys Leu Thr Ser Ser Gly Lys Cys Pro

35 40 45

acc ggt ttt ccg aaa atg att gaa ggt cgt gag acg tcg tcc gca acc 192  
 Thr Gly Phe Pro Lys Met Ile Glu Gly Arg Glu Thr Ser Ser Ala Thr

50 55 60

gag acg acc acc gag acg gcc acc aag tcg gag gag gct gcc aag gag 240  
 Glu Thr Thr Thr Glu Thr Ala Thr Lys Ser Glu Glu Ala Ala Lys Glu

65 70 75 80

acg gcg acg gag cac gac gag ctc tga tag gat ccg gct gct aa 284  
 Thr Ala Thr Glu His Asp Glu Leu \*\*\* \*\*\* Asp Pro Ala Ala

85 90 94

## フロントページの続き

(72)発明者 平井 正名

愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道41番  
地の1 株式会社豊田中央研究所内

(72)発明者 嶋村 隆

愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道41番  
地の1 株式会社豊田中央研究所内

(72)発明者 幸田 勝典

愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道41番  
地の1 株式会社豊田中央研究所内

(72)発明者 村本 伸彦

愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道41番  
地の1 株式会社豊田中央研究所内

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA05 BA67 BA80 CA04

CA07 DA06 EA04 GA11 HA03

HA06

4B064 AG01 CA02 CA19 CC24 CE04

CE06 CE20

4B065 AA26X AA58Y AA89Y AB01

AC14 BD45 CA41 CA44

4H045 AA10 AA20 BA10 BA41 CA10

CA30 EA01 EA29 FA16 FA74

GA06